昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2010, 53(6): 601 -610 ISSN 0454-6296

家蝇幼虫消减文库的构建及差异表达基因的鉴定

李殿香[1]，康翠洁[2]，张 伟[2]，王金星[2,*]，赵小凡[2]
（1. 济南大学医学与生命科学学院，济南 250022；2. 山东大学生命科学学院，济南 250100）

摘要：为了鉴定家蝇 *Musca domestica* 免疫相关基因，应用抑制性消减杂交技术，构建刺激家蝇幼虫差异表达 cDNA 消减文库。以大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 诱导 12 h 的家蝇幼虫与未诱导的家蝇幼虫为消减杂交对象，获得了差异表达基因的 cDNA 片段，将其与 T/A 载体连接并转化大肠杆菌 DH5α，构建了刺激家蝇幼虫 cDNA 消减文库。PCR 检测发现，文库的阳性克隆中插入的 cDNA 片段大小在 200 ~ 1 000 bp 之间，随机挑选了 161 个含大小不等差异片段的克隆进行测序和同源性分析，鉴定了 36 种蛋白的基因片段，包括抗菌肽、酶、核糖体蛋白、其他功能蛋白以及功能不明的蛋白。用半定量 RT-PCR 分析了其中 6 种蛋白基因的表达，结果显示：防御素和攻击素基因在细菌刺激后 24 h 内明显上调表达，而溶菌酶、酚氧化酶原活化因子、糜蛋白酶和蛋白质合成起始因子基因在细菌刺激后 0 - 4 h 内表达受抑制，12 h 后上调表达。该研究结果为家蝇免疫相关基因的克隆和家蝇免疫防御机制的探讨奠定了良好的基础。

关键词：家蝇；抑制性消减杂交；cDNA 消减文库；差异表达基因；半定量 RT-PCR
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)06-0601-10

Construction of a suppression subtractive hybridization cDNA library to identify differentially expressed genes from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae

LI Dian-Xiang[1], KANG Cui-Jie[2], ZHANG Wei[2], WANG Jin-Xing[2,*], ZHAO Xiao-Fan[2] (1. School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan, Jinan 250022, China; 2. School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: To identify immune-related genes in housefly (*Musca domestica*) larvae, suppression subtractive hybridization (SSH) was performed to generate a subtracted cDNA library between bacteria-challenged (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* mixture) housefly larvae (Tester) and control housefly larvae (Driver) using the PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit according to the manufacturer's protocol. The subtracted target cDNAs were ligated into the pGEM-T-Easy vector using T4 DNA ligase and transformed into *E. coli* DH5α competent cells. Positive white clones were randomly selected and sequenced after PCR detection. PCR analysis showed that the white bacteria clones contained inserts of 200 - 1 000 bp. The sequences inserted were used to search GenBank with BLASTX. A series of ESTs of 36 kinds of proteins including antibacterial peptides, enzymes, ribosome proteins and other functional proteins as well as unknown proteins, were isolated from 161 clones sequenced randomly. RT-PCR analysis revealed that two differentially expressed genes, defensin gene and attacin gene, were up-regulated in housefly larvae challenged for 24 h, while the genes encoding other proteins like lysozyme 1, prophenoloxidase activating factor, chymotrypsin and eukaryotic translation initiation factor were first down-regulated in housefly larvae challenged for 0 - 4 h and then up-regulated at 12 h post treatment. These results have established a solid foundation for cloning immune-relevant genes from *M. domestica* and further studying immune mechanism in housefly.

Key words: *Musca domestica*; suppression subtractive hybridization; cDNA subtractive library; differentially expressed genes; semi-quantitative RT-PCR

基金项目：国家自然科学基金项目(30800839)；山东省中青年科学家奖励基金项目(2008BS06010)
作者简介：李殿香，女，1963 年生，博士，副教授，主要从事动物生化与分子生物学研究，E-mail：dianxiangli@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jxwang@sdu.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-01-21；接受日期 Accepted: 2010-03-29

家蝇 *Musca domestica* 属于双翅目昆虫，主要在腐物和垃圾等含有大量细菌的恶劣环境中生长，其体表带有 60 多种病原菌，能够传播多种疾病(Rahuma *et al*., 2005)，但家蝇自身却不受这些病原菌的感染，说明家蝇对病原微生物有着强大的免疫力，这也预示着家蝇体内存在着独特的免疫防御机制(宫霞等，2007)。家蝇的免疫防御系统与脊椎动物的不同，一般不存在适应性免疫(Hoffmann, 1995)，主要靠产生凝集素、溶菌酶、抗菌蛋白及抗菌肽等行使体液免疫，而抗菌肽是抵御病原物侵袭的重要因子。研究发现，家蝇幼虫经细菌诱导后会有多种与抗菌有关的蛋白/多肽开始表达或加强表达(安春菊等，2003；许兵红等，2007)，而且，家蝇体内的抗菌肽不只一种(Rutschmann *et al*., 2000；马红霞等，2007)。本实验室克隆得到了多个家蝇抗菌肽的基因(王来城等，2003；Liang *et al*., 2006；Ren *et al*., 2009)。除了已报道的家蝇抗菌肽基因以外，经细菌诱导的家蝇体内究竟还有多少新的免疫相关基因，目前尚不清楚。

抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)是一种有效克隆差异表达基因的新方法(Diatchenko *et al*., 1996)，在差异表达基因鉴定中应用广泛(Rebrikov *et al*., 2004；Straub *et al*., 2004；Zeng and Lu, 2009)，但目前尚未见在家蝇中应用的报道。本研究利用 SSH 方法，成功构建了细菌诱导 12 h 家蝇幼虫对非诱导家蝇幼虫的差异表达 cDNA 消减文库，并对该消减文库进行了初步筛选，获得了一批差异表达的 cDNA 片段，为进一步克隆家蝇免疫相关基因奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

家蝇幼虫为本实验室饲养；大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态菌株 DH5α、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 为本实验室保存。

1.2 试剂

RNA 提取所用 Unizol 试剂为 Biostar 公司(中国上海)产品；mRNA 纯化试剂盒为 Promega 公司产品；Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 为 Clontech 公司产品；Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 为 MBI 公司(中国上海)产品；r*Taq* DNA 聚合酶、Ex-*Taq* DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker、λDNA *EcoR* Ⅰ/*Hin*d Ⅲ Marker、pGEM-T-Easy 载体为 TaKaRa Biotechnology 公司(中国大连)产品；Agarose 为 BIOASIA 公司产品；Tryptone 和 Yeast Extract 为 BBI 公司产品；氨苄青霉素为 AMRESCO 公司(中国上海)产品；IPTG，X-Gal 和 T_4 DNA 连接酶为 Sangon 公司(中国上海)；其余试剂为国产分析纯。

1.3 家蝇的针刺诱导

将冻存的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌种复苏，离心收集对数生长期的细胞，用灭菌水稀释成 OD_{600} = 1.0，将两种菌液等体积混匀，用 1 mL 无菌注射器针头蘸取少量混合菌液，轻扎 3 龄幼虫后腹部，每头 1 针，共刺激 100 头，12 h 后，选生长状态良好的幼虫 10 头提取诱导幼虫的总 RNA，挑选同等饲养条件下大小与生活力相似的 10 头正常 3 龄幼虫作为对照提取 RNA。

1.4 诱导与非诱导家蝇总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

参照 Unizol 试剂使用说明书的步骤提取总 RNA，经质量检测合格后，合并 3 次独立实验提取的总 RNA，按 PolyATract mRNA Isolation Systems 试剂盒(Promega 公司，美国)的操作流程分离 mRNA。

1.5 cDNA 消减杂交文库的构建

用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 构建 cDNA 消减杂交文库。

分别取 2 μg 诱导与非诱导家蝇幼虫 mRNA，逆转录成双链 cDNA，诱导的称为 Tester，非诱导的称为 Driver，Tester 和 Driver 的双链 cDNA 均用四碱基识别酶 *Rsa* Ⅰ 酶切。只有 Tester cDNA 连接头，Driver cDNA 不加接头。把酶切的 Tester cDNA 分为 2 份，各自连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adaptor 1 和 Adaptor 2R，再分别与过量的酶切平头的 Driver cDNA 于 68℃ 杂交 8 h。紧接着合并两种杂交产物，加入新的过量的酶切 Driver cDNA 作第 2 次杂交(68℃，16 h)，获得的 cDNA 分子两端每条单链上带有不同的接头，使 Tester 中高表达而 Driver 中低表达和 Tester 中有表达而 Driver 中无表达的 cDNA 片段得以富集。将抑制性消减杂交后的产物作模板，分别用两对引物(试剂盒提供)进行两次抑制性 PCR 扩增。第 1 次扩增，选用接头外侧引物，扩增两端带有不同接头的 cDNA；第 2 次扩增，以第 1 次 PCR 产物为模板，选用接头内侧巢式引物，进一步扩增差异表达的 cDNA 序列并降低本底。将纯化的第 2 次 PCR 产物

与 pGEM-T-Easy 载体于 16℃水浴中过夜连接，连接反应液 10 μL，其内有 4.0 μL PCR 产物、1.0 μL 载体和 5.0 μL 含 DNA 连接酶的连接液。将构建的重组质粒转入感受态细胞 *E. coli* DH5α，建成 cDNA 消减杂交文库。

1.6　cDNA 消减杂交文库的筛选

将转化好的细菌接种至含氨苄青霉素(50 mg/L)，IPTG(0.5 mmol/L)和 X-gal (80 mg/L)的 LB 琼脂平板上，37℃过夜培养，形成蓝白斑。随机挑取白斑克隆，用载体两端通用引物进行 PCR 检测，PCR 程序为：95℃ 5 min；68℃ 5 min，加 r*Taq* 酶；然后进入后面的循环：94℃ 30 s，55℃ 45 s，72℃ 1.5 min，重复 33 个循环后，72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经电泳检测为阳性的，进行扩增培养。

1.7　测序及序列分析

测序工作由生工生物工程(上海)有限公司完成，序列分析在 NCBI 数据库 GenBank BLASTx 中完成。

1.8　差异基因的半定量 RT-PCR 分析

按上述方法刺激家蝇 3 龄幼虫，分别提取非诱导与诱导 2，4，6，12 和 24 h 各 3 头幼虫的总 RNA，合成 cDNA 为 PCR 的模板。选用核糖体蛋白基因(*rp49*)作内参基因，进行 6 个目的基因表达变化的 RT-PCR 检测。扩增这 6 个目的基因和内参基因的引物序列见表 1。

表 1　半定量 RT-PCR 的引物

Table 1　List of primers for semi-quantitative RT-PCR

基因名称 Gene names	引物序列 Primer sequence (5′-3′)
糜蛋白酶基因 Chymotrypsin gene (*chy*)	F：AGATCTCTGACTCTGCCTCCG
	R：GTCGACATCGATACGCGTGGTC
蛋白质合成起始因子基因	F：CGGAGATTCTGGTGCTTCTC
Eukaryotic translation initiation factor 5A gene (*eif*)	R：GTCGACATCGATACGCGTGGTC
溶菌酶基因 Lysozyme 1 gene (*lys*)	F：ATCCAACGGCCGTTTCTCC
	R：GTCGACATCGATACGCGTGGTC
防御素基因 Defensin gene (*def*)	F：CTGTGCTGCCCATTGTCTGTTGC
	R：GTCGACATCGATACGCGTGGTC
攻击素基因 Attacin gene (*att*)	F：TTGCCATATTATCCACCACCCACT
	R：GCTATTGTTGAAGATGTTGACACC
酚氧化酶原活化因子基因 Prophenoloxidase activating factor gene (*pap*)	F：TCGCCACTGGTCTGTCCTATTC
核糖体蛋白 49 基因 Ribosome protein 49 gene (*rp49*)	F：TACAGGCCCAAGATCGTGAA
	R：GACAATCTCCTTGCGCTTCT

PCR 条件为 94℃ 3 min，94℃ 30 s，55℃ 40 s，72℃ 40 s，重复 23 个循环后，72℃延伸 10 min。用凝胶成像软件 QuantityOne (Bio-Rad, California, USA) 对电泳图像进行分析，计算出目的基因与内参基因的光密度比值，依据 3 组平行实验的光密度比值的平均值作柱形图，分析目的基因的相对表达量。

1.9　数据统计与分析

用 Excel 软件计算 3 组平行实验结果的平均值和标准偏差($X \pm SD$)，并将诱导 2，4，6，12，24 h 的实验结果分别与非诱导(0 h)的实验结果进行 *t*-检验，得出 *P* 值，在 0.01 和 0.05 水平上比较差异显著性。

2　结果

2.1　双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳

图 1 是诱导与非诱导家蝇幼虫双链 cDNA (dscDNA)琼脂糖凝胶电泳图。本实验使用的诱导与非诱导家蝇幼虫总 RNA 经电泳检测，28S 与 18S 两条带清晰，经紫外分光光度计检测 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8～2.0 之间(结果未出示)，说明提取的总 RNA 样品完整，纯度较高。从这些总 RNA 样品中分离出 mRNA，然后将 mRNA 逆转录成 dscDNA。琼脂糖凝胶电泳检测显示，dscDNA 为弥散状，分布范围在 200～1 000 bp 之间，可以用于抑制性消减杂交实验。

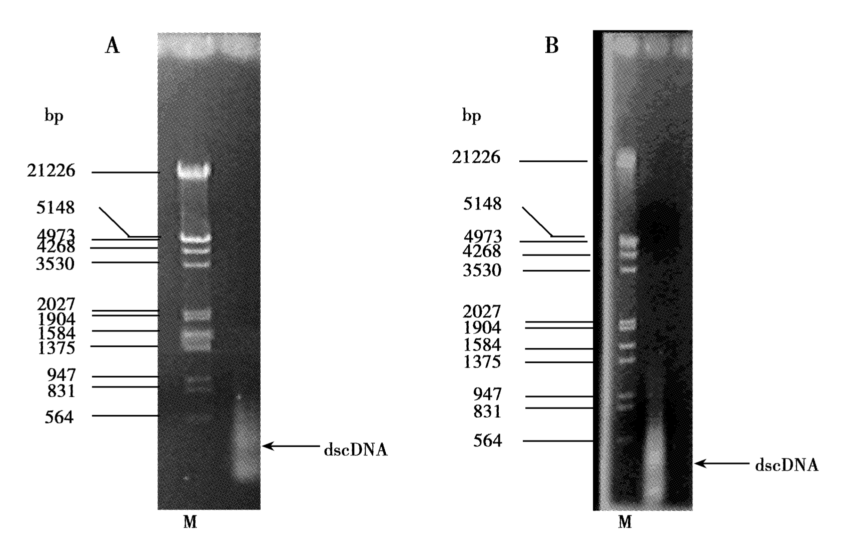


图 1 诱导(A)与非诱导(B)家蝇双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 1% Agarose gel electrophoresis of dscDNA from challenged (A) and unchallenged (B) houseflies

M: DNA 分子量标准 λDNA *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ Marker.

2.2 抑制性消减杂交结果

合成的 Tester 与 Driver dscDNA 经 *Rsa*Ⅰ单酶切、加接头用于抑制消减杂交，杂交产物通过两轮抑制性 PCR，形成了均一化的消减产物，经电泳检测发现，第 1 轮 PCR 产物呈拖带状，亮度弱。第 2 轮 PCR 扩增后，产物明显增多，拖带的亮度加强，拖带范围在 200 ~ 1 000 bp 之间，另外，消减后的扩增带的亮度比消减前的扩增带要弱，而且，消减后第 2 轮 PCR 产物中出现了 cDNA 特异条带(图 2)。这表明 Tester 与 Driver 相同表达的基因已被消减，而差异表达的低丰度的基因得到了富集。

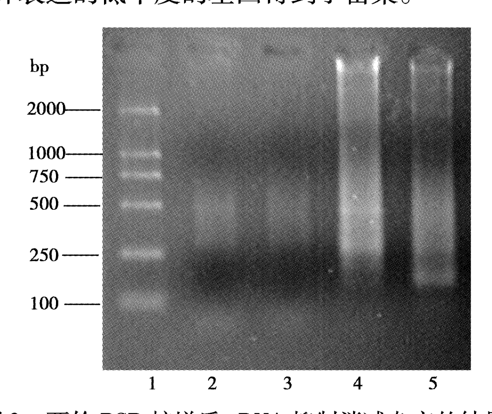


图 2 两轮 PCR 扩增后 cDNA 抑制消减杂交的结果

Fig. 2 Electrophoretic analysis of the subtraction results of cDNA amplified with two round PCR (2% agarose gel)

1: DNA 分子量标准 DL2000 Marker; 2: 消减前第 1 轮 PCR 产物 The 1st-round PCR products of Tester cDNA before subtraction; 3: 消减后第 1 轮 PCR 产物 The 1st-round PCR products of Tester cDNA post subtraction; 4: 消减前第 2 轮 PCR 产物 The 2nd-round PCR products of Tester cDNA before subtraction; 5: 消减后第 2 轮 PCR 产物 The 2nd-round PCR products of Tester cDNA post subtraction.

2.3 SSH 文库筛选

将消减后的第 2 轮 PCR 产物与 T 载体的连结产物，转化 *E. coli* DH5α 细胞，先经过蓝白斑筛选出白色阳性克隆，再经 PCR 扩增鉴定，结果显示，随机挑取的 310 个白色克隆中，95% 的均有外源插入片段，片段大小在 200 ~ 1 000 bp 之间，这与消减后的 cDNA 大小相符，同时也表明构建的家蝇幼虫的消减文库有很高的阳性率(图 3)。

2.4 差异表达基因鉴定

从细菌刺激家蝇幼虫 12 h 的消减文库中，随机选取了 161 个有大小不同扩增带的阳性克隆进行测序，测序结果经 GenBank BLASTx 分析，筛选出了 47 个有效的差异表达基因的 cDNA 片段(表 2)。其余 114 个 cDNA 片段在基因库中找不到同源片段或同源性太低，暂作无效基因片段看待。在这 47 个差异表达的 cDNA 片段中，有些基因片段如防御素、溶菌酶、核糖体蛋白 L5 等被多次重复挑到，说明该消减库中的 cDNA 片段是富集的。基因同源性分析显示，这 47 个差异表达的 cDNA 片段编码 36 种蛋白，它们可以被归为抗菌肽、酶、核糖体蛋白、其他功能蛋白和未知功能蛋白等 5 类。其中，抗菌肽 3 种，它们是防御素、攻击素和溶菌酶，共 7 个 cDNA 片段，占测序克隆的 4.3%；筛出的酶类有 11 种，包括酚氧化酶原活化因子、糜蛋白酶、dicer、天冬氨酸蛋白酶和羧肽酶 5 种水解酶，还有细胞色素氧化酶、细胞色素 P450、脂酰脱氢酶、NADH：泛醌氧化还原酶、烯酰还原酶和过氧化氢酶 6 种氧化还原酶，共 12 个 cDNA 片段，

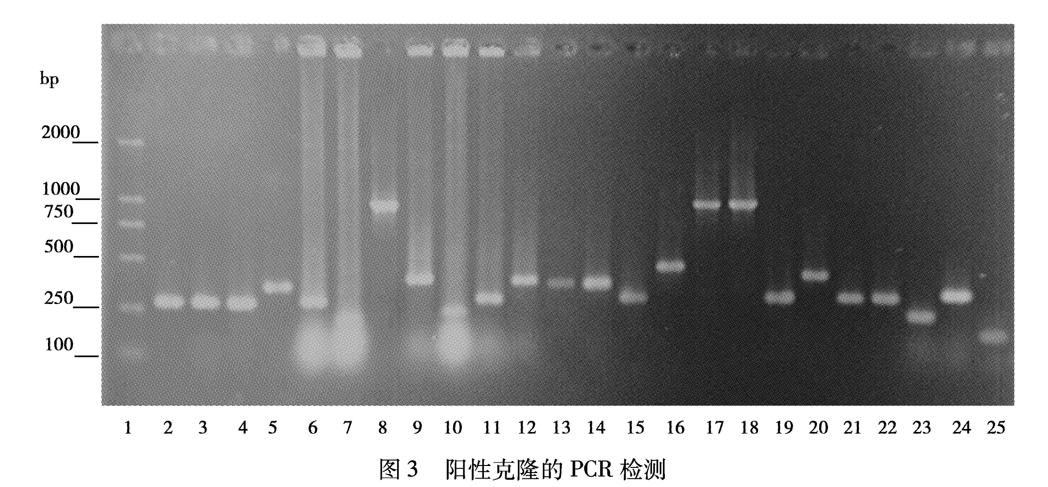


图 3　阳性克隆的 PCR 检测

Fig. 3　Electrophoretic analysis of PCR identification of inserted fragments on a 1% agarose gel

1：DNA 分子量标准 DL2000 DNA Marker；2 – 25：阳性克隆 PCR 产物 Inserted fragments of white clones.

占测序克隆的 7.5%；另外筛出 9 种核糖体蛋白，它们是 L5，L6，L9，L11，L14，L30，L36A，S23 和 S25 共 12 个 cDNA 片段，占 7.5%；其他功能蛋白 6 种，包括内化素、蛋白酶体亚基、蛋白质合成起始因子、角质层蛋白、信号分子和孕酮受体共 7 个 cDNA 片段，占 4.3%；还有未知功能蛋白 7 种，9 个 cDNA 片段，占测序克隆的 5.6%。

表 2　细菌刺激家蝇幼虫 12 h 消减文库中部分差异表达基因的序列分析

Table 2　Sequence analysis of differentially expressed genes in subtractive library made of tester cDNA of bacteria-challenged housefly larvae subtracted with driver cDNA of unchallenged larvae

基因类别 Gene classification	编号 No.	序列长度(bp) Length of inserted cDNA	同源基因 Homologous gene	期望值 Expected value	筛选频率 Selected frequency	基因功能 Gene function
抗菌肽 Antibacterial peptide	1	220	AAP33451 (*Musca domestica*)	7e-10	4	防御素 Defensin
	2	268	ACO35258 (*Musca domestica*)	2e-09	1	攻击素 Attacin
	3	340	AAQ20048 (*Musca domestica*)	9e-47	2	溶菌酶 Lysozyme 1
酶 Enzyme	4	280	CAC12696 (*Tenebrio molitor*)	9e-23	1	酚氧化酶原活化因子 Prophenoloxidase activating factor
	5	253	AAA68986 (*Lucilia cuprina*)	4e-19	1	糜蛋白酶 Chymotrypsin
	6	251	EAT47261 (*Aedes aegypti*)	6e-18	1	Dicer-1
	7	240	ABM69085 (*Musca domestica*)	1e-22	1	天冬氨酸蛋白酶 Aspartic proteinase
	8	172	EAL30742 (*Drosophila pseudoobscura*)	2e-08	1	羧肽酶 Carboxypeptidase
	9	286	AAP23072 (*Coelopa nebularum*)	4e-15	1	细胞色素氧化酶亚基Ⅱ Cytochrome oxidase subunit Ⅱ
	10	219	AAL13523 (*Drosophila melanogaster*)	6e-08	1	细胞色素 P450 Cytochrome P450
	11	184	AAN31393 (*Musca domestica*)	2e-04	1	脂酰脱氢酶 Fatty acyl-CoA desaturase

续表 2 Table 2 continued

基因类别 Gene classification	编号 No.	序列长度(bp) Length of inserted cDNA	同源基因 Homologous gene	期望值 Expected value	筛选频率 Selected frequency	基因功能 Gene function
	12	746	NP_ 647836 (*Drosophila melanogaster*)	7e-28	2	烯酰还原酶 Enoyl reductase
	13	777	CAA59444 (*Campylobacter jejuni*)	7e-08	1	过氧化氢酶 Catalase
	14	216	EAL33544 (*Drosophila pseudoobscura*)	3e-04	1	NADH：泛醌氧化还原酶 NADH：Ubiquinone oxidoreductase
核糖体蛋白 Ribosome protein	15	245	NP_001036390 (*Drosophila melanogaster*)	1e-20	3	核糖体蛋白 L5 Ribosomal protein L5
	16	310	NP_001037132 (*Bombyx mori*)	1e-15	2	核糖体蛋白 L6 Ribosomal protein L6
	17	162	CAA64319 (*Drosophila melanogaster*)	6e-05	1	核糖体蛋白 L9 Ribosomal protein L9
	18	296	NP_001037215 (*Drosophila melanogaster*)	5e-36	1	核糖体蛋白 L11 Ribosomal protein L11
	19	250	CAC41629 (*Drosophila virilis*)	9e-23	1	核糖体蛋白 L14 Ribosomal protein L14
	20	377	NP_524687 (*Drosophila melanogaster*)	1e-28	1	核糖体蛋白 L30 Ribosomal protein L30
	21	244	NP_609179 (*Drosophila melanogaster*)	7e-22	1	核糖体蛋白 L36A Ribosomal protein L36A
	22	246	CAH04343 (*Biphyllus lunatus*)	3e-24	1	核糖体蛋白 S23 S23e ribosomal protein
	23	314	NP_524315 (*Drosophila melanogaster*)	5e-20	1	核糖体蛋白 S25 Ribosomal protein S25, isoform A
其他 Others	24	278	EAT42392 (*Aedes aegypti*)	1e-22	1	内化素 Internalin A
	25	237	EAT41978 (*Aedes aegypti*)	1e-12	1	蛋白酶体亚基 Proteasome subunit beta type 6, 9
	26	650	P62924 (*Spodoptera exigua*)	9e-39	1	蛋白质合成起始因子 Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)
	27	379	XP_316041 (*Anopheles gambiae str.* PEST)	1e-10	1	角质层蛋白 Cuticular protein
	28	245	ABJ17060 (*Drosophila melanogaster*)	7e-17	2	可能为信号分子 May be PDZ_signaling
	29	220	BAC29608 (*Mus musculus*)	4e-06	1	可能是孕酮受体 May be progesterone receptor
未知 Unknown	30	244	EAL34039 (*Drosophila pseudoobscura*)	2e-09	1	未知功能 Unknown protein
	31	207	EAL33555 (*GA17298-PA*)	2e-09	2	未知功能 Unknown protein

续表 2　Table 2 continued

基因类别 Gene classification	编号 No.	序列长度(bp) Length of inserted cDNA	同源基因 Homologous gene	期望值 Expected value	筛选频率 Selected frequency	基因功能 Gene function
	32	307	EAL33336 (*Drosophila pseudoobscura*)	4e-09	1	未知功能 Unknown protein
	33	321	EAL25333 (*Drosophila pseudoobscura*)	2e-07	1	未知功能 Unknown protein
	34	233	EAL30742 (*Drosophila pseudoobscura*)	9e-10	1	未知功能 Unknown protein
	35	386	XP_001653008 (*Aedes aegypti*)	5e-10	1	未知功能 Unknown protein
	36	240	XP_001866421 (*Culex quinquefasciatus*)	4e-04	2	未知功能 Unknown protein

2.5　差异基因的半定量 RT-PCR 分析

家蝇幼虫消减文库中的这 6 个目的基因在细菌诱导后是差异表达的，但表达模式不同。图 4 是这 6 个差异表达基因的半定量 RT-PCR 分析的结果。

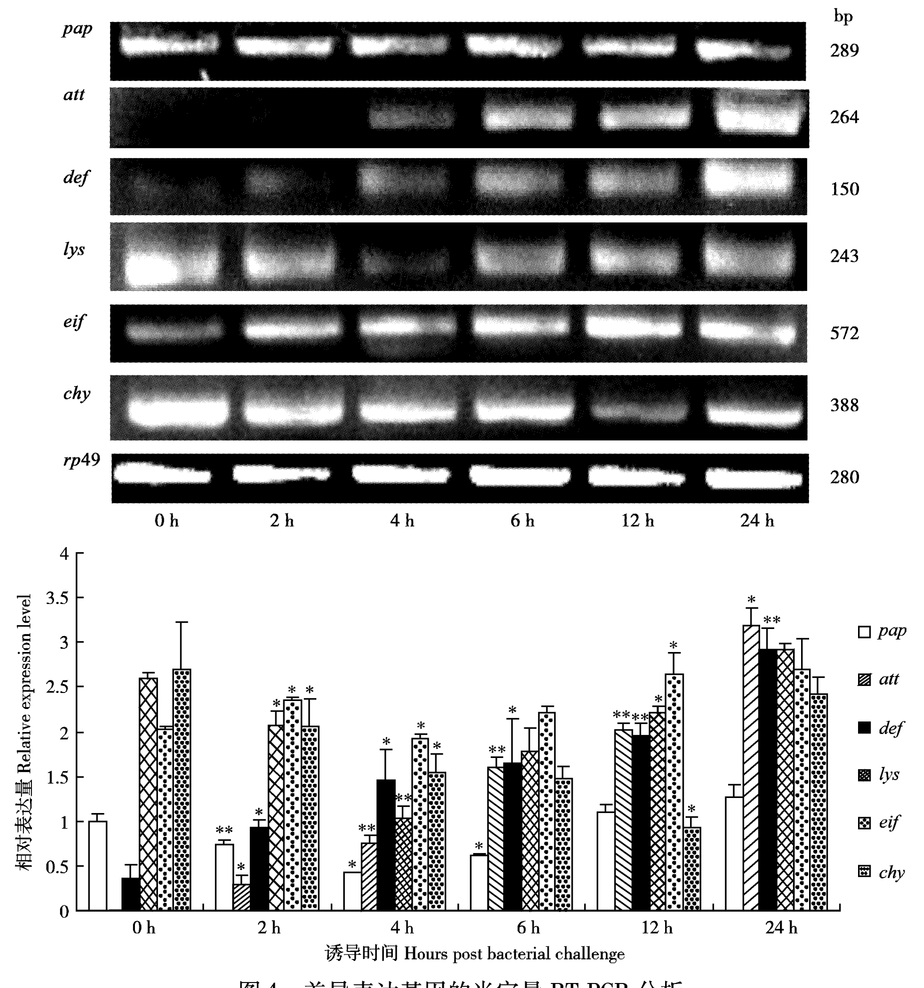


图 4　差异表达基因的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 4　Semi-quantitative RT-PCR analysis of gene expression in challenged and unchallenged housefly larvae

相对表达水平是 3 组独立实验检测的目的基因与 *rp49* 基因比值的平均值，星号代表重要差异（*，$P<0.05$；**，$P<0.01$）。Relative expression levels were normalized with *rp49*. The results are based on three independent experiments and expressed as mean ± *SD*. The asterisks indicate significant differences（*，$P<0.05$；**，$P<0.01$）from the unchallenged sample.

攻击素基因(*att*)、防御素基因(*def*)明显上调表达。*att* 在非诱导家蝇幼虫中不表达，*def* 在非诱导家蝇幼虫中极少量表达，细菌诱导 2 h 时 *att* 与 *def* 都少量表达，诱导 2 h 后它们的表达量不断增加，随着诱导时间的延长，在诱导 24 h 内一直递增，并在诱导 24 h 时达最大。

溶菌酶基因(*lys*)在诱导初期表达下调，在诱导 4 h 时表达量降到最低，从诱导 6 h 开始表达量急剧增加，并在之后的诱导 12 – 24 h 的时间内持续上调表达。

蛋白质合成起始因子基因(*eif*)在诱导后的24 h 内总体表达趋势是上调的，但变化幅度不大。诱导 2 h时，*eif* 表达量略有增加，诱导 4 h 时，*eif* 表达量比诱导 2 h 的还略有下降，从诱导 6 h 以后，继续上调表达。

糜蛋白酶基因(*chy*)和酚氧化酶原活化因子基因(*pap*)也与 *lys* 一样，在诱导 24 h 内，呈现先下调后上调的表达趋势。*chy* 从诱导后 0 – 12 h 里一直表达下调，在诱导 24 h 时明显上调表达。*pap* 表达最低点也是在诱导 4 h，诱导 6 h 的表达量开始增加，诱导 12 h 的表达量略超过非诱导家蝇幼虫的表达，到诱导 24 h 时已上调表达，不过，*pap* 和 *chy* 相比，下调与上调的变化幅度不大。

3 讨论

家蝇幼虫不仅对不同细菌的刺激有特异性反应，而且，经 G^-和 G^+细菌诱导后，抗菌蛋白的含量会成百倍地增加(侯利霞等，2006)。由此说明，家蝇抗菌物质的产生与家蝇抗菌能力的提高有着紧密的联系。因此，鉴定家蝇幼虫经细菌诱导后的差异表达基因，对家蝇抗菌物质的开发和家蝇免疫防御机制的探讨具有重要意义。

3.1 抑制性消减杂交技术

抑制性消减杂交(SSH)技术(Diatchenko *et al.*, 1996)是分离差异表达基因片段的有效方法。SSH 经过 Tester 与 Driver 两次杂交，可有效富集 Tester 中差异表达基因的 cDNA 片段，随后的两次 PCR，又使 Tester 中带有不同接头的差异表达基因的 cDNA 片段有效扩增，提高了特异性，增加了 Tester 中低丰度目标 cDNA 片段检出的可能。尽管 SSH 技术具有较高的消减效率和差异基因筛出率，但是假阳性现象依然存在。要得到理想的结果，一方面，选取的 Tester 与 Driver 样品应该具有足量的消减空间或表达差异，经 SSH 可以消减去二者共同的序列，来有效富集 Tester 中差异表达的基因片段；另一方面，构建高质量的 cDNA 消减文库是筛出差异表达基因片段的保障。

本研究充分注意了以上两个方面，选取了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌混合液诱导 12 h 家蝇幼虫的 cDNA 为 Tester，未诱导家蝇幼虫的 cDNA 为 Driver，经过一次 SSH 反应，从细菌诱导家蝇幼虫的 Tester 中，初步筛选出了编码 36 个蛋白基因的 47 个 cDNA 片段，用半定量 RT-PCR 检测了其中 6 个基因的表达模式，结果显示，这些基因在诱导后的 24 h 内整体表达趋势是上调的，尤其 *att* 和 *def* 诱导后明显上调表达，说明筛出的基因在诱导前后有表达差异。由此也证明，SSH 技术的确是一种比较简便、高效寻找差异表达基因的好方法。

3.2 家蝇幼虫免疫相关基因

家蝇缺乏获得性免疫系统，其能够有效抵御病原菌的侵袭完全依靠独特的天然免疫反应。当家蝇表皮这道有效的物理屏障被打破之后，会诱导产生效应物来愈合伤口、防止微生物扩散。基于参与的效应物的性质将免疫反应分为细胞免疫反应与体液免疫反应两类。细胞免疫反应由血细胞介导，导致吞噬作用和包被作用。体液免疫反应依赖于血淋巴，导致血淋巴凝结、黑化和抗菌肽合成。黑化依赖于酚氧化酶的活性，酚氧化酶催化酚生成醌，导致黑化。一般，酚氧化酶是以非活化的前体物——酚氧化酶原的形式存在，酚氧化酶原通过丝氨酸蛋白酶水解而被激活。家蝇受到病原微生物侵染或损伤时，脂肪体细胞能快速合成一些抗菌肽，分泌到血淋巴，杀死入侵的病原微生物。细胞免疫反应与体液免疫反应一起构成了家蝇对微生物感染的有效保护。

在感染病菌时，家蝇免疫系统会对入侵物识别，并引发包括吞噬作用、包被作用、激活蛋白酶级联反应和黑化作用以及诱导抗菌肽合成等一系列免疫反应，从而清除或消灭入侵物。吞噬作用在昆虫的防御机制中有重要作用，在吞噬前、吞噬过程中和吞噬后，各种水解酶、氧化酶和抗氧化酶发挥了重要作用(晏容等，2008)。本研究也得出了同样的结果，不仅从细菌诱导家蝇 3 龄幼虫 12 h 的消减文库中，筛出了丝氨酸蛋白酶(*chy* 和 *pap*)、Dicer、天冬氨酸蛋白酶和羧肽酶 5 种水解酶基因，还筛选到了细胞色素氧化酶、细胞色素 P450、烯酰还原酶、脂酰脱氢酶、NADH：泛醌氧化还原酶

和过氧化氢酶 6 种氧化还原酶基因，而且还发现丝氨酸蛋白酶基因(*chy* 和 *pap*)在细菌诱导后 24 h 内的表达趋势是先下调后上调，推测在家蝇幼虫感染病菌的初期，*chy* 和 *pap* 基因表达受抑制，诱导 24 h后加强表达，以参与对细菌的免疫反应。

抗菌肽是昆虫感染病原菌后，由血细胞及脂肪细胞在瞬时分泌的一类能够抵抗大多数微生物侵染的小分子多肽。抗菌肽基因的表达主要受两种信号转导途径的调控：Toll 途径和 Imd 途径。Toll 途径主要是在真菌和 G^+ 细菌侵染时被激活的，Imd 途径主要是被 G^-细菌侵染时激活的。Imd 途径控制着抗菌肽基因 *att* 和 *def* 的诱导性表达。有报道表明，在家蝇各生长阶段，抗菌肽基因 *att*，*def* 和天蚕素(cecropin)基因表达水平存在明显差异，而且在幼虫发育期的表达呈增强趋势(金小宝等，2008)。本研究结果也验证了这点，从细菌诱导家蝇幼虫 12 h 消减文库的 161 个阳性克隆中，筛出了 3 种抗菌肽的 7 个基因片段，其中 4 个是 *def*，1 个是 *att*，另外两个是 *lys*，而且 *def* 和 *att* 在诱导后 2 h 瞬时上调表达。本研究没有筛选到抗菌肽 cecropin 基因，可能是测序的克隆数有限，也有可能是建库时 cecropin 基因还未表达。总起来看，抗菌肽基因 *att* 和 *def* 与家蝇感染病菌初期的抗性有重要关系。

在预测的功能蛋白中有 7 种是核糖体大亚基蛋白，2 种是核糖体小亚基蛋白。核糖体蛋白除了组建核糖体参与蛋白质的合成外，可能还参与家蝇的免疫反应。有报道，对应于 *Helicobacter pylori* 核糖体蛋白 L1 N-末端序列的肽 HP(2-20)有杀线虫的活性，可能通过破坏线虫卵壳结构和在细胞膜脂双层上形成小孔的方式发挥作用。此肽还有抗多种真菌的活性，可以破坏白色假丝酵母的细胞质膜(Lee *et al*., 2002；Jang *et al*., 2004)。所以，不能简单地认为核糖体蛋白的出现就说明与免疫作用无关。可能有些免疫相关基因是编码其他功能蛋白的基因在某种特定条件下的另一种转录产物。同时，多个核糖体基因的出现也说明免疫刺激可能激活家蝇中某些基因的转录，而且这些基因应该与免疫作用有关。

目前来看，36 个蛋白的免疫功能仅少数是清楚的，如丝氨酸蛋白酶，主要参与调节昆虫血淋巴凝结、抗菌肽合成和黑化包裹等过程，是介导昆虫先天免疫反应的关键酶(晏容等，2008)；溶菌酶是一种小分子碱性蛋白，能够水解细菌细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡糖之间的 β-1，4 糖苷键，使细胞内容物逸出，从而对 G^-和 G^+细菌有一定程度的溶解作用(Ren *et al*., 2009)；防御素可以杀灭和抑制 G^-、G^+和病毒(王来城等，2003；金小宝等，2008)；攻击素杀灭和抑制 G^-、G^+和真菌等等(徐家华等，2007)。而对大部分蛋白的免疫功能不了解，如 Internalin(内化素)、Dicer 酶、众多的核糖体蛋白和未知功能的蛋白，它们在家蝇免疫中的作用有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

An CJ, Shi M, Hao YJ, Sheng CZ, Geng H, Li DS, Du RQ, 2003. Inducement and activity analysis of antibacterial-related proteins/peptides in house-fly larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 46(5): 545 – 548. [安春菊，石明，郝友进，盛长忠，耿华，李德森，杜荣骞，2003. 家蝇幼虫抗菌相关蛋白/多肽的诱导及抗菌活性分析. 昆虫学报，46(5): 545 – 548]

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and liberaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12): 6025 – 6030.

Gong X, Hu SK, Le GW, 2007. Electrophoretic preparation and antibiosis mechanism of antibacterial peptide MDL-2 from *Musca domestica* larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 50(12): 1212 – 1218. [宫霞，胡树凯，乐国伟，2007. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 的电泳制备及其抗菌作用机理. 昆虫学报，50(12): 1212 – 1218]

Hoffmann JA, 1995. Innate immunity of insect. *Current Opinion in Immunology*, 7: 4 – 10.

Hou LX, Zhai P, Shi YH, Le GW, 2006. Induced responses on the antibacterial proteins/peptides in the larvae of housefly by different bacteria. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(6): 827 – 831. [侯利霞，翟培，施用晖，乐国伟，2006. 不同细菌对家蝇幼虫抗菌蛋白/肽的诱导效应. 昆虫知识，43(6): 827 – 831]

Jang SH, Park Y, Park SC, Kim PI, Lee DG, Hahm KS, 2004. Antinematodal activity and the mechanism of the antimicrobial peptide, HP(2-20), against *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol. Lett.*, 26(4): 287 – 291.

Jin XB, Wang Y, Zhu JY, Ma Y, Chu FJ, Yang XR, 2008. Expression analysis of antibacterial peptide genes at different development stages of *Musca domestica*. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.*, 26(3): 187 – 190. [金小宝，王艳，朱家勇，马艳，楮夫江，杨小蓉，2008. 家蝇生长发育各阶段抗菌肽基因表达情况的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，26(3): 187 – 190]

Lee DG, Kim PI, Park Y, Jang SH, Park SC, Woo ER, Hahm KS. 2002. HP(2-20) derived from the amino terminal region of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 exerts its antifungal effects by damaging the plasma membranes of *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.*, 8(8): 453 – 460.

Liang YL, Wang JX, Zhao XF, Du XJ, Xue JF, 2006. Molecular cloning and characterization of cecropin from the house fly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Dev. Comp.*

Immunol., 30(3): 249 – 257.

Ma HX, Sun N, Pei ZH, Gao G, 2007. Research progress on antibiotic peptide of *Musca domestica*. *Chin. J. Veter. Drug*, 41(11): 45 – 49. ［马红霞，孙娜，裴志花，高光，2007. 家蝇抗菌肽的研究进展. 中国兽药杂志，41(11): 45 – 49］

Rahuma N, Ghenghesh KS, Ben Aissa R, Elamaari A, 2005. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Libya. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 99(8): 795 – 802.

Rebrikov DV, Desai SM, Siebert PD, Lukyanov SA, 2004. Suppression subtractive hybridization. *Methods Mol. Biol.*, 258: 107 – 134.

Ren Q, Zhao XF, Wang JX, 2009. Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*). *J. Genet. Genomics*, 36: 7 – 16.

Rutschmann S, Jung AC, Zhou R, Silverman N, Hoffmann JA, Ferrandon D, 2000. Role of *Drosophila* IKKγ in a Toll-independent antibacterial immune response. *Nature Immunology*, 1(4): 342 – 347.

Straub PF, Higham ML, Tanguy A, Landau BJ, Phoel WC, Hales LS, Thwing TKM, 2004. Suppression subtractive hybridization cDNA library to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats. *Mar. Biotechnol.*, 6(4): 386 – 399.

Wang LC, Wang JX, Wang LY, Zhao XF, 2003. Cloning and sequence analysis of the full-length cDNA encoding defensin, an antimicrobiol peptide from the housefly (*Musca domestica*). *Acta Zoologica Sinica*, 49(3): 408 – 413. ［王来城，王金星，王来元，赵小凡，2003. 家蝇防御素基因的 cDNA 克隆及序列分析. 动物学报，49(3): 408 – 413］

Xu BH, Zeng LP, Chen P, 2007. Induction of antibacterial substance in the housefly by *Staphylococcus aureus*. *Modern Preventive Medicine*, 34(16): 3023 – 3024, 3027. ［许兵红，曾莉萍，陈萍，2007. 金黄色葡萄球菌对家蝇抗菌物质的诱导. 现代预防医学，34(16): 3023 – 3024, 3027］

Xu JH, Zhu JY, Jin XB, Xu QY, 2007. Cloning and expression of antibacterial peptide attacin gene isolated from *Musca domestica* larvae and its biological activities. *J. Med. Mol. Biol.*, 4(1): 20 – 26. ［徐家华，朱家勇，金小宝，许琴英，2007. 家蝇抗菌肽 Attacin 基因的克隆表达及抑菌生物学活性. 医学分子生物学杂志，4(1): 20 – 26］

Yan R, Liu H, He LF, Wan QH, 2008. Activity change of three enzymes in serum of the *Musca domestica* larva infected by *Escherichia coli*. *Chin. J. Vector. Biol. Control*, 19(5): 426 – 428. ［晏容，刘晖，贺莉芳，万启惠，2008. 大肠埃希菌感染后家蝇幼虫血清中 3 种酶活性的变化. 中国媒介生物学及控制杂志，19(5): 426 – 428］

Zeng Y, Lu CP, 2009. Identification of differentially expressed genes in haemocytes of the crayfish (*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus by suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays. *Fish Shellfish Immunol.*, 26(4): 646 – 650.

（责任编辑：赵利辉）